بررسی اثر کافور بر سلول‌های لایدیگ و غلظت هورمون‌های LH و تستوسترون در موش آزمایشگاهی نر بالغ نژاد Balb/C

مریم عابدینی[۱]، وحیدحمایت خواه جهرمی[۱*]، محسن فروزان فر[۲]، حسین کارگر جهرمی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران

۲ـ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، گروه زیست شناسی، مرودشت، ایران

۳ـ عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران

مسئول مکاتبات: Dr.hemayatkhah@yahoo.com

چکیده

کافور، گیاهی متعلق به خانواده برگ بو است که احتمالاً در کنترل قوای جنسی مؤثر است. در این تحقیق اثر کافور بر اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گرفته است. پارامترهای بررسی شده شامل تعداد سلول‌های لایدیگ، اسپرم و غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH می‌باشد. حیوانات مورد آزمایش ۳٦ سر موش سوری نر بالغ با میانگین وزن ۱ ± ۳٤ گرم و سن۱۰ هفتگی بودند. حیوانات به ۹ گروه ٤ تایی تقسیم شدند. در گروه کنترل هیچ تزریقی انجام نشد. به گروه‌های شم تیمار و پس از تیمار، روغن زیتون به عنوان حلال کافور و به گروه های تجربی ۱، ۲ و۳ محلول کافور با دوزهای ۵ ،۲۰ و۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد. گروه‌ها به دو صورت تیمار و پس از تیمار طبقه بندی شدند. گروه تیمار یک روز وگروه پس از تیمار یک هفته پس از آخرین روز تزریق تشریح شدند. تزریق به صورت درون صفاقی به مدت ١٤ روز انجام شد. پس از اتمام تزریقات، موش‌ها توزین شدند. پس از تشریح، خونگیری و تهیه مقاطع بافتی انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های لایدیگ و اسپرم و غلظت هورمون های تستوسترون و LH در گروه‌های تجربی در سطح ۰/۰۵ > P افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. بنابراین، باتوجه به تغییرات هورمونی در گروه‌های تجربی که بیشتر در گروه تجربی متوسط دیده می‌شود می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کافور وابسته به دوز عمل کرده و احتمالاً باعث افزایش اسپرماتوژنز می‌گردد.

کلمات کلیدی: کافور، لایدیگ، تستوسترون، LH، موش سوری

مقدمه

یکی از داروهایی که مورد توجه بسیاری از محققین قرار دارد کافور است. کافور از تیره برگ بو است و در تمام قسمت‌های گیاه، اسانس سینامالدهید پراکنده است [۱]. اسپرماتوژنز در داخل لوله‌های منی‌ساز بیضه انجام می‌شود و در نتیجه‌ی تحریک توسط هورمون‌های گنادوتروپیک هیپوفیز قدامی شروع شده و در سرتاسر عمر ادامه دارد. عوامل هورمونی که اسپرماتوژنز را تحریک می‌کند عبارتند از تستوسترون، استروژن، FSH، LH و هورمون رشد. علاوه بر این عواملی مثل درجه حرارت محیط، تغذیه، سن و دارو نیز نقش دارند [١٤]. تحقیقات گسترده‌ای روی این گیاه انجام شده است. ترکیبات عصاره دی کامفور باعث افزایش فشار خون در افراد مسن می‌شود [۱۸]. کافور همچنین باعث خیز و بخش بخشی شدن لوله‌ای و نکروزیس بافت بینابینی در کلیه می‌شود [۵]. تزریق دوز بالای کافور در طی دوران جنینی و نوزادی، محور هیپوفیز ـ گناد را در موش نر مهار می‌کند [۳]. کافور برسیستم باروری موش اثر می‌گذارد و باعث تغییرات معنی دار بر ساختار رحم می‌شود [۱۰]. محرک‌های جنسی بدست آمده برای بیضه مخرب است و اثر آن بر جنس مؤنث نیز موجب کاهش ترشح شیر می‌شود [۲۰]. کافور،یک اثر عمیق و وابسته به دوز روی آناتومی گنادها در هر دو جنس دارد و تکوین اووسیت و اسپرماتوسیت را مهار می‌کند [۸]. کافور ماده‌ای است که باعث سقط جنین می شود و به عنوان عامل ضد لانه‌گزینی و جلوگیری از آبستنی است [۷]. بنابراین کافور می‌تواند در مراکز باروری و داروسازی و گیاه‌شناسی مفید

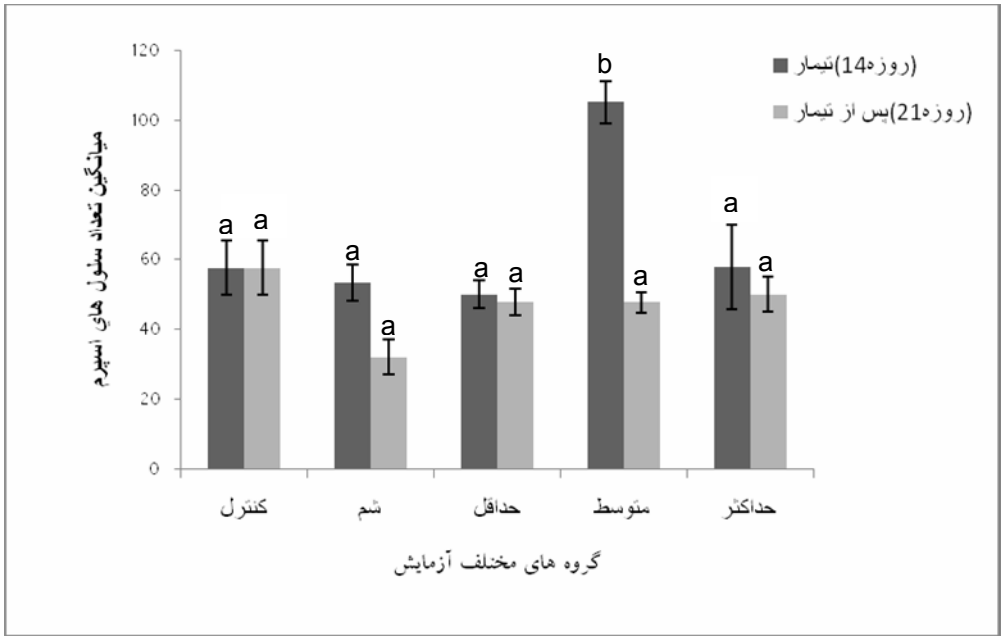
واقع شود. در تحقیق حاضر، اثر کافور بر سلول‌های لایدیگ و غلظت هورمون‌های LH و تستوسترون در موش سوری نر بالغ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

حیوان مورد آزمایش در این تحقیق، ۳٦ سرموش سوری نر بالغ نژاد Balb/C در محدوده وزنی ۱ ± ۳٤ گرم و سن ۱۰ هفتگی بود که از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شد. درجه حرارت محیط در طول مدت آزمایش، ۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد ودوره روشنایی ـ تاریکی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد. تغذیه حیوان توسط غذای مخصوص موش و آب آشامیدنی حیوانات آب لوله کشی شهر بود. حیوانات به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط محیط در حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم نگهداری شد. پارامترهای مورد بررسی شامل شمارش تعداد سلول‌های اسپرم، لایدیگ و غلظت هورمون های تستوسترون و LH بود. پودر کافور از یکی از مراکز معتبر فروش داروهای گیاهی خریداری شد. ۱۰ گرم از این پودر را برداشته و به آن ۱۰۰ سی‌سی هیدروالکل ۷۰٪ (اتانول) اضافه شد. سپس آن را در بن ماری بادرجه حرارت ٤۰ درجه سانتی گراد قرار داده تا تبخیر شود و رسوب تشکیل شود. از ۱۰ گرم پودر ناخالص حدود ۷/۱ گرم پودر خالص به دست آمد. پس از تعیین دوز کشنده کافور، پودر خالص کافور در روغن زیتون حل شد و غلظت های ۵ ،۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم که زیر دوز کشنده بود تهیه شد. در گروه کنترل تزریقی انجام نشد. گروه شم، حلال کافور یعنی روغن زیتون دریافت کرد و گروه‌های تجربی ۱،۲و۳ به ترتیب دوزهای ۵، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم دارو دریافت کردند. تزریق، روزانه به روش درون صفاقی و به مقدار ۰/۰۲ سی‌سی انجام شد. همه حیوانات ١٤ روز دارو دریافت کردند. حیوانات به دو گروه تقسیم شدند. گروه تیمار که یک روز پس از آخرین روز تزریق تشریح شدند و گروه پس از تیمار که یک هفته دوره استراحت داشت و پس از ۲۱ روز تشریح شد. پس از تشریح و خونگیری، غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH به وسیله کیت های مخصوص هورمون به روش الیزا اندازه گیری شد. جهت شمارش سلول‌های لایدیک و اسپرم،بافت بیضه خارج و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی و توزین، در تثبیت کننده فرمالین قرار داده شد. پس از تهیه قالب‌های پارافینی، برش هایی به ضخامت ۵ میکرون از بافت با دستگاه میکروتوم تهیه شد و پس از رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین–ائوزین، بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفتند. برای شمارش سلول‌ها، از هر بافت ۱۰ برش تهیه شد و از هر برش ۵ فیلد میکروسکوپی انتخاب شد و پس از شمارش سلول‌ها و میانگین گرفتن هر پارامتر، به عنوان عدد نهایی مربوط به پارامتر برای هر لام منظور گردید. داده‌ها با استفاده از برنامه SPSS و آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن و T-test تفسیر شد. سطح معنی داری، $P < ۰/۰۵$ قرار داده شد. طبق روش دانکن، در هر گروه اگر یک حرف مشترک وجود داشته باشد تفاوت معنی داری وجود ندارد [۲] .

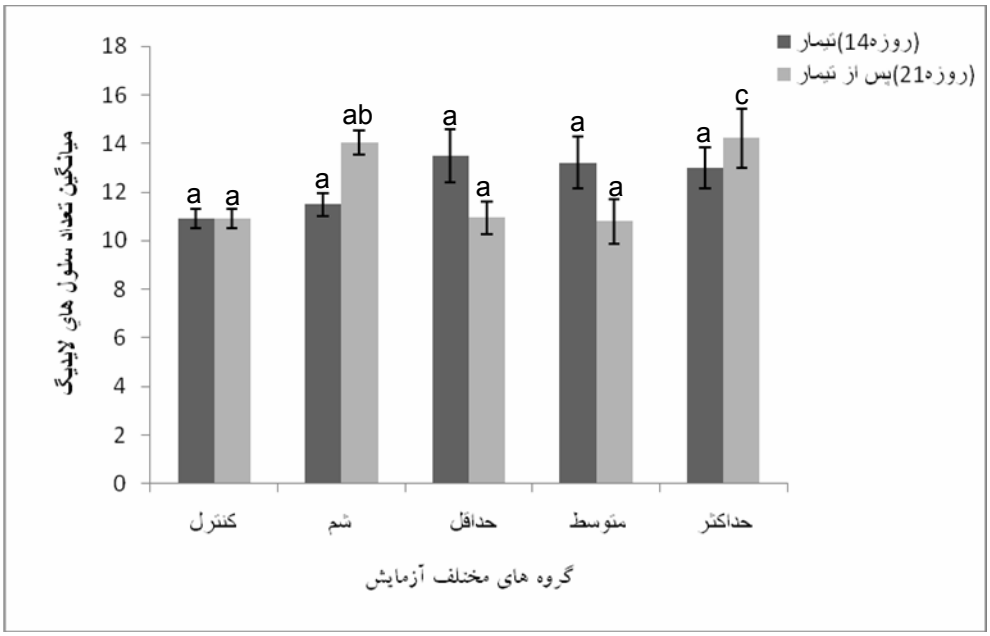
نتایج

نتایج حاصل از مقایسه میانگین تعداد سلول های اسپرم و لایدیگ در گروه های تجربی با گروه های کنترل، افزایش معنی‌داری را در سطح $P <۰/۰۵$ نشان می‌دهد (نمودارهای ۱ و ۲). همچنین مقایسه غلظت هورمون های LH وتستوسترون در گروه های تجربی در مقایسه با گروه های کنترل نشان دهنده افزایش معنی دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است (نمودارهای ۳ و٤).



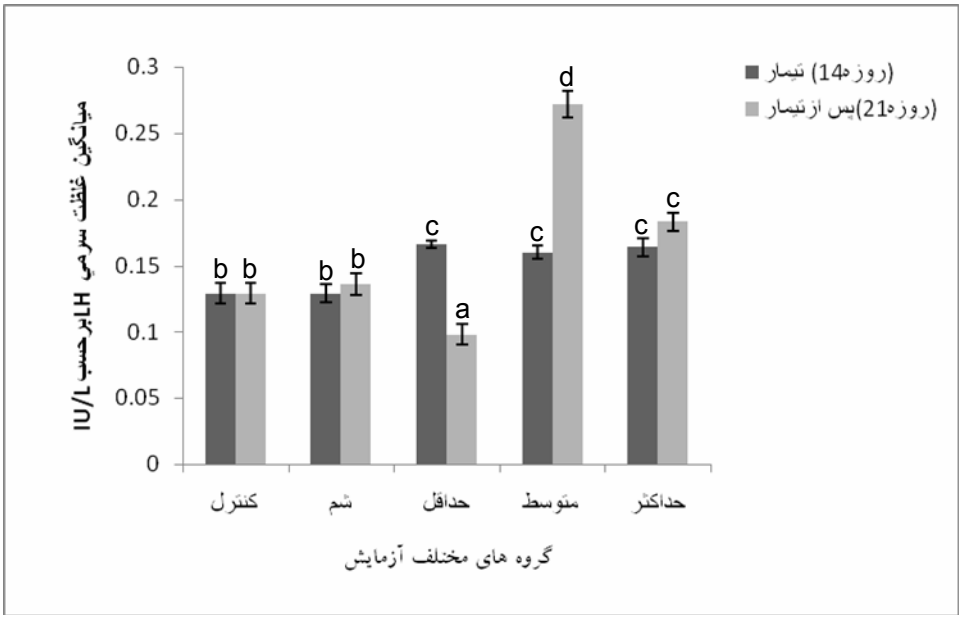
نمودار ۱ـ اثر کافور بر میانگین تعداد سلول های اسپرم

حرف b نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل در سطح P < ۰/۰۵ است.



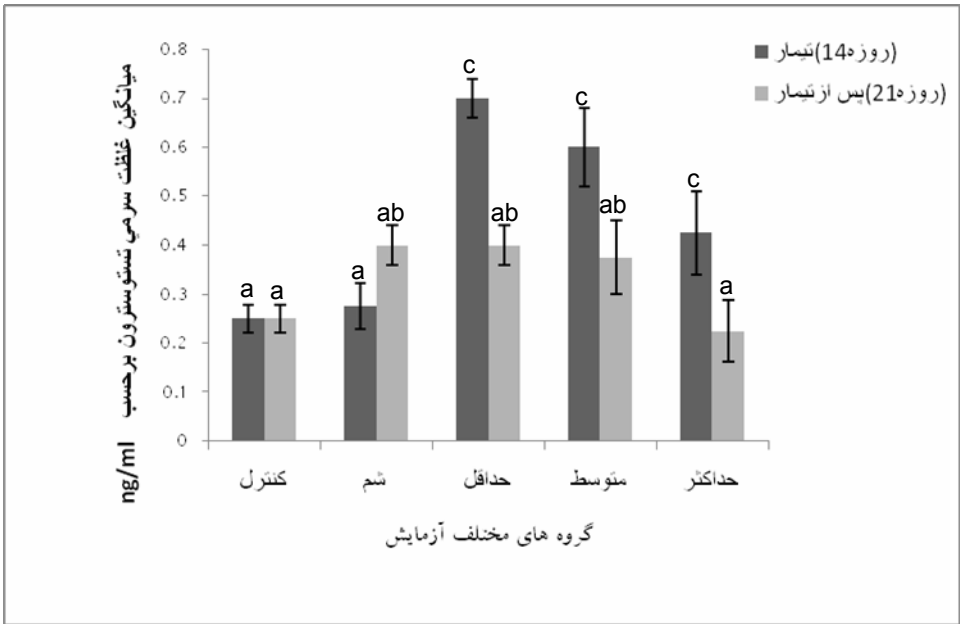
نمودار ۲ـ اثر کافور بر میانگین تعداد سلول های لایدیگ

حرف c نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل در سطح P < ۰/۰۵ است.



نمودار ۳ـ اثر کافور بر غلظت سرمی هورمون LH

حرف a و c و d نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل در سطح P < ۰/۰۵ است.



نمودار ٤ـ اثر کافور بر غلظت سرمی هورمون تستوسترون

حرف c نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح P < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل است.

بحث

نتایج تحقیق نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های لایدیگ واسپرم و غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH در گروه های تجربی در مقایسه با کنترل افزایش داشته است (نمودارهای ۱، ۲، ۳ و٤). یکی از ترکیبات کافور، سینامالدهید است که باعث افزایش ترشح نوراپی نفرین شده و نوراپی نفرین، ترشح اکسید نیتریک را تحریک می کند. نوراپی نفرین آزادسازی LH را به واسطه اکسید نیتریک زیاد می کند [۱۵ و ۱۷].

هورمون پرولاکتین توسط کافور مهار می شود. این هورمون وابسته به غلظت عمل می‌کند. افزایش پرولاکتین منجر به کاهش حساسیت گیرنده LH که همان سلول های لایدیگ است شده و در نتیجه ترشح تستوسترون کاهش می یابد. از آنجا که کافور باعث مهار پرولاکتین می شود در نتیجه حساسیت گیرنده LH افزایش یافته و ترشح تستوسترون بالا می رود [٦ و ۹].

همچنین مهار پرولاکتین باعث توقف تولید اکسید نیتریک می‌شود. در نتیجه روی هیپوتالاموس اثر مهاری گذاشته و ترشح GnRH هم مهار می‌شود. به منظور جبران این کمبود، مکانیسم فیدبک منفی راه اندازی شده و کلسترول از بافت بیضه نفوذ کرده و به پرگننولون تبدیل می‌شود و استروئیدوژنز رخ می‌دهد [١٦]. تستوسترون،عامل بقای اسپرماتوژنز و به عنوان مهم ترین هورمون های مؤثر در روند اسپرماتوژنز است [۱۲ و ۱۹].

سلول‌های لایدیگ انسان و سلول‌های سرتولی تولید کننده اینترلوکین ۱ و ٦ هستند. مشخص شده که اینترلوکین ۱ و ٦ توسط چندین دسته سلولی در بیضه موش تولید می شود و در کنترل پاراکرین عملکرد بیضه درگیر هستند. mRNA ی اینترلوکین ۱ و ٦ و پروتئین ها به وسیله سلول های لایدیگ و سرتولی رشد یافته تولید می شوند. باتوجه به واکنش سلول به سلول بین لایدیگ، سرتولی و تأثیرکافور بر سلول لایدیگ،اثر این ماده بر هیپوتالاموس و تغییر در مقدار ترشح FSH نیز محتمل است[٤].

کافور وابسته به دوز عمل کرده و بر روی گنادهای هر دو جنس اثر می گذارد [۱۱]. این ماده در دوز بسیار بالا باعث کاهش اسپرماتوژنز و در دوز پایین باعث افزایش آن می شود. افزایش میل جنسی توسط کافور ممکن است از طریق افزایش سنتز تستوسترون در موش‌های نر باشد. همچنین اثر کافور روی رفتار جنسی ممکن است از طریق تنظیم عصبی سمپاتیک اتفاق افتد [۷]. با کاهش دوز، امکان سمیت هم کاهش می‌یابد[۱۳]. البته در مورد غلظت هورمون تستوسترون مقادیر مورد بررسی در این تحقیق همگی نشاندهنده افزایش فرایند اسپرماتوژنز نسبت به گروه کنترل هستند ولی در مقایسه سه دوز مورد بررسی با همدیگر اختلافات کاهش غلظت هورمون تستوسترون دیده می شود که با یکدیگر معنی دار نیستند و این احتمال وجود دارد که اگر دوز بالاتری مورد بررسی قرار گیرد می تواند روند کاهشی را در فرایند اسپرماتوژنز به دنبال داشته باشد که این حالت در رابطه با تستوسترون مشخص تر است (نمودار ٤).

بنابراین با توجه به افزایش غلظت هورمون تستوسترون به خصوص در دوزهای حداقل و متوسط نسبت به گروه کنترل و همچنین افزایش معنی دار غلظت هورمون LH و نقش این هورمون ها در فرایند تقسیم سلول های جنسی و افزایش تعداد سلول های لایدیگ، می توان نتیجه گیری کرد که کافور احتمالاً بر روند اسپرماتوژنز و میزان باروری مؤثر است. به هرحال بهتر است تحقیقات گسترده تری در این زمینه انجام شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی و کارکنان آزمایشگاه فیزیولوژی و جنین شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم که در اجرای این کار تحقیقاتی همکاری داشته اند تقدیر و سپاسگزاری می شود.

منابع

۱- زرگری، ع، ۱۳۷٦، گیاهان دارویی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحه ۳٤٤-۳۳۵.

2- Basiri. A.(1999), Statistical designs in agricultural sciences. Shiraz University Press. 50-56.

3-Carou.ME., Szwarcfarb.B., Deguiz.ML., Reynoso.R., Carbone.S., Moguilevsky.JA., Scacchi,P and Ponzo.OJ., (2009), Impact of 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC)during embryonic and fetal development in the neuroendocrine regulation of testicular axis in prepubertal and peripubertal male rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 117(9):449:454.

4-Cudicini.C., Lejeune.H., Gomes.E., Bosmans.E., Ballet.F., Saez.J and Jegou.B., (1997), Human Leydig cells and sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6.*The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(5):1426-1433.

5-Eweka.AO., Adjene.JO and Enaibe.BU., (2008), Histological studies of the teratogenic effects of camphor on the developing kidney of the wistar ret. *Annals of Biomedical Sciences,* 7(1&2).

6- Hussein.MO and Zipfw.B., (1987), Characteristics of prolactin modulate induction of LH,hCG receptor. *J Androl*, 8(6):388-92.

7-Jamshidzadeh.A., Sajedianfard.J., Nekooeian.A., Tavakoli.F and Omrani.GH., (2006), Effects of camphor on sexual behaviors in male rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(4):209-214.

8-Kunz.PY., Gries.T and Fent.K., (2006), The uv filter 3-benzylidene camphor adversely affects reproduction in fathead minnow (Pimephales promelas). *Toxicology Sciences,* 93(2): 311-321.

9-Lergo.MB., Bouhdibo.MP and Peyrat. JS., (1989), Peripheral effect of prolactin in reproduction function. J *Gynecol Obstet Boil Reprod(Paris)*, 18(1):39-45.

10- Linjawi.SA., (2009), Effect of camphor on uterus histology of pregnant rats. *The Journal of King Abdulaziz University-medical Sciences*, 16(2).

11- Maria.EC., Osvaldo.JP., Romina.P., Berta.S., Maria.LD., Reynoso.R., (2008), Low dose 4-MBC effect on neuroendocrine regulation of reproductive axis in adult male rats . *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 26(2):222-224.

12- Matzkin. H., Chen.J., Lewyshon.O., Ayalon.D and Braf.Z., (1992), Effects of long term trearment with finasteride(MK-906),5-alpha reductase inhibitor on circulating LH,FSH,prolactin and estradiol. *Horm Metab Res,* 24(10):498-9.

13-Nikravesh.MR and Jalali.M., (2004), The effect of camphor on the male mice reproductive system. *Urology*, 1(4):268-272.

14- Pareek.TK., Joshi.AR., Sanyal.A and Dighe RR., (2007), Insight into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*, 12(6):100-1085.

15- Parivzi.N and Ellendorff.F., (1982), Further evidence on dual effects of norepinephrine on LH secretion. *Neuro Endocrinolog*, 35(1):48-55.

16- Punta.KD., Charreau. EH.,(1996), Nitricoxide inhibits Leydig cell steridogenesis . *Endocrinology*, 133:5337-5343.

17- Sato.Y and Tsukanmamoto.T., (2000), Effects of nitric oxide stimulation on the brain. *Drugs Today*, 36(2-3):38.

18- Werner.NS., Duschek.S and Schandry.R ., (2009), D-camphor-crataegus berry extract combination increases blood pressure and cognitive functioning in the elderly-a randomized,placebo controlled double blind study. *Phytomedicine*, 16(12):82-1077.

19- West.JB., (2001), Best and taylor's, physiological basic of medical practice. 12:1-550.

20-William.C., (1869), The Physiomedical Dispensatory. http://medherb.com/